

食品材料としての小麦胚芽に関する研究

Ⅱ 小麦胚芽中のトリプシン・インヒビターの 2, 3の性質について

渡辺 紀子^{*}・野本 美子^{**}

Studies on Wheat Germ as a Food Material

Ⅱ Some Properties of Trypsin Inhibitors in Wheat Germ

Noriko Watanabe and Mitsuko Nomoto

I. 緒 言

植物タンパク質には、ある種の哺乳動物の消化酵素の働きを阻害するものが何種類か知られている。この生化学的に活性なタンパク質として最初に見い出されたものは大豆のトリプシン・インヒビターであり¹⁾、この発見以来、多くの研究者により、哺乳動物のプロテアーゼ・インヒビターが豆類をはじめ種々の植物組織中から単離されている²⁾。

すでに小麦胚芽中にも4種類のトリプシン・インヒビターの存在が認められ³⁾、2種類のインヒビターが単離されている⁴⁾。しかし最近、この小麦胚芽が食品材料として利用されるようになり、これらの利用された食品中には、なお、トリプシン・インヒビター活性が認められていることが明らかにされた。

そこで本研究では、まず小麦胚芽中のトリプシン・インヒビターの分離・精製を行ない、得られたこれらのインヒビターが、体内でプロテアーゼに対して、どのような挙動を示すのかを、*in vitro*で検討した。また、植物に存在する代表的なプロテアーゼ・インヒビターとして最もよく知られている、大豆のトリプシン・インヒビターと比較、検討した。

Ⅱ. 実験方法

1. 試 料

カナダ・ウェスタン種の硬質小麦胚芽 (1975年産) を日清製粉より入手し、石油エーテルで脱脂後、粉砕

して実験に用いた。

2. 小麦胚芽中のトリプシン・インヒビターの分離・精製⁴⁾

脱脂小麦胚芽 200g に精製海砂 200g を加えて、乳鉢中で混合磨砕し、さらにこれに少量の 0.1M-塩化ナトリウム水溶液を加え、ペースト状になるまで十分に混和し、時々攪拌しながら2時間放置し、その抽出液を60°C30分、熱処理した後、このロ液に硫酸を加えて80%飽和させる。この混合液を一夜放置後、沈殿物を集めて、水 1*l* に溶解し、遠心分離 (1,000~1,200×g, 15分) して、水に不溶なグロブリン系のタンパク質を除去する。この溶液を DEAE-Sephadex A-25 (pH. 8.0 M/20 トリス・塩酸緩衝液) カラム中を通して脱色後、Bio-Gel P-30 (pH 2.0~2.5, 0.1M-塩化ナトリウム/0.01M-塩酸緩衝液) 及び、CM-Sephadex C-25 に流し、その活性画分を分画し精製トリプシン・インヒビター A 及び、B を得た。

3. トリプシンとトリプシン・インヒビターとの反応⁴⁾

トリプシンとトリプシン・インヒビターを2:1の割合でM/20 トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 溶解し、ビスキングチューブに入れ、図1に示すように、あらかじめ37°Cにしておいた緩衝液中に入れ、恒温機中で37°Cを保ち、スターラーで緩衝液をたえず混合しながら反応させた。反応後、5°Cの状態の水に対して外液が Cl⁻ free になるまで透析を行なった。この時トリプシンによって加水分解されたものは低分子ペプチドになり、膜外に出るため膜内には、インヒビターとトリプシンの複合体のみが残ることになる。この複合体を

* 奈良県栄養職員

** 本学食品化学研究室

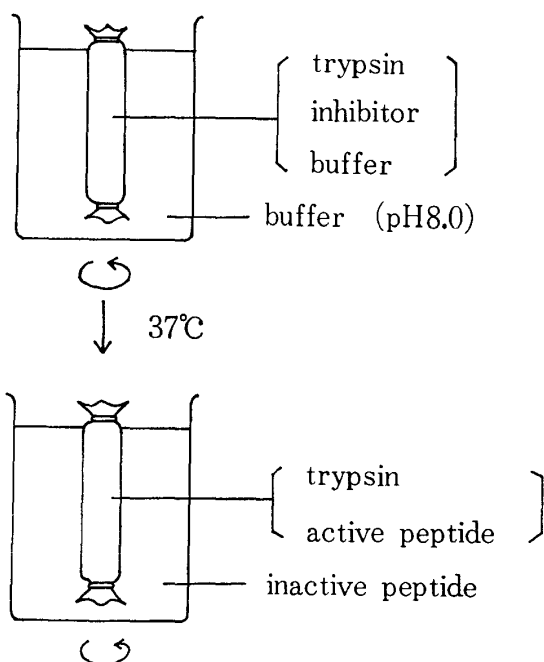


図1 トリプシンとトリプシン・インヒビターとの反応方式

pH 2.0 ぐらいにすると、トリプシンとインヒビターに分かれるので、この性質を利用して Bio Gel P-30 で生成物を分画し、元のインヒビターと性質を比較した。

4. 阻害活性の測定

トリプシン・インヒビターのトリプシンに対する阻害活性は 2-N-benzoyl-D, L-arginine-P-nitroanilide (BAPNA) を基質とする BAPNA 法⁵⁾を用いて測定した。

5. 分離したトリプシン・インヒビターの純度の確認

ディスク電気泳動⁶⁾, Sephadex G-75 カラムによるゲルろ過を用いた。

6. 分子量の測定

7% SDS 電気泳動法⁷⁾ 及び Sephadex G-75 カラムによるゲルろ過⁸⁾ を用いて測定した。標準タンパクとして、チトクロム-C (分子量 13,000), キモトリプシノーゲン (25,000), 卵白アルブミン (45,000), 牛血清アルブミン (67,000) を用いた。

7. N-末端アミノ酸の決定⁹⁾

ダンシルクロリド法を用いて、試料の N-末端アミノ酸を測定した。試料の N-末端アミノ酸をダンシル化し、K. R. Woods, K. T. Wang によるポリアミド薄層を用いて、アミノ酸の同定を行なった。標準ダンシル・アミノ酸として、L- α -アラニン, L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸, L-スレオニン, グリシン, L-バリン, L-プロリン, L- β -フェニールアラニン, L-シスチンを用いた。

8. タンパク質構成アミノ酸の定量

酸により加水分解を行ない、日立自動アミノ酸分析機 (KLA-5B) でアミノ酸組成の定量を行なった。

III. 結果および考察

1. トリプシン・インヒビターのペプシンによる影響

まず各インヒビターを、ペプシンと 10:1, 5:1, 2:1 の比率 (モル), pH 2.0, 37°C で反応させ、その阻害活性の変化を調べた。その結果は図 2 に示すごとくで

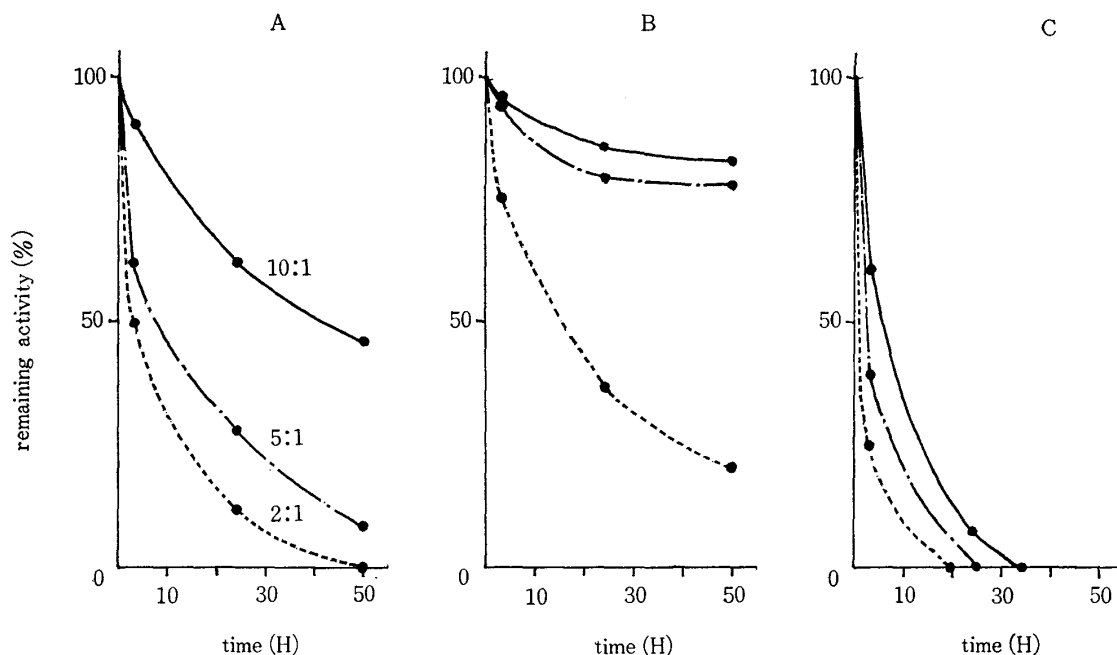


図2 ペプシンによるトリプシン・インヒビターの消化

A: 小麦胚芽インヒビターA B: 小麦胚芽インヒビターB C: 大豆インヒビター

ある。

インヒビター A とペプシンの場合、比率10:1では、反応時間3時間で10%、24時間で38%、50時間で54%の失活が認められた。5:1では、3時間、24時間、50時間と反応時間が長くなるにつれて、48%、72%、92%と失活した。また2:1では、50%、89%と失活し、50時間では完全に阻害活性が失われた。インヒビター B においては、10:1で5%、14%、17%、5:1で6%、20%、22%と失活し、2:1では、25%、64%、80%と失活した。これに対して、大豆インヒビターでは、10:1では、3時間で39%、24時間で92%、34時間で完全に失活した。5:1では、3時間で61%、24時間で完全に失活し、2:1では、3時間で75%、20時間で失活した。このように、インヒビター A、B は、大豆インヒビターに比べて、ペプシンに対して安定であることがわかった。これらのことより、哺乳動物の胃の中でインヒビターが完全に失活することは不可能であることが予測される。そのために次に、インヒビターのトリプシンとの相互作用について検討してみた。

2. トリプシン・インヒビターおよびトリプシンとの反応生成物について

2-1 トリプシンおよび生成物の分子量

小麦胚芽中のトリプシン・インヒビターおよび大豆インヒビターの生成物は、それぞれトリプシンに対して、強い阻害活性を示した。これらインヒビターおよび生成ペプチドの分子量を Sephadex G-75 カラムによるゲルろ過と SDS 電気泳動法を用いて測定した。

ゲルろ過により分子量を測定した結果、インヒビター A は 17,000、A-ペプチドは 6,000 であった (図

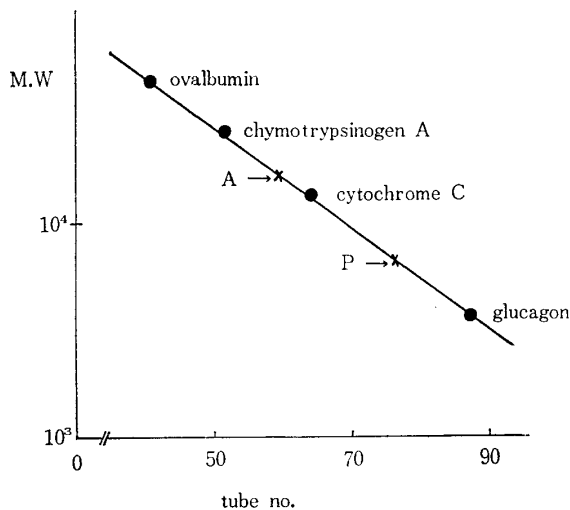


図3 ゲルろ過による小麦胚芽インヒビター A および生成ペプチドの分子量

A: 小麦胚芽インヒビター A, P: 生成ペプチド

3)。また SDS 電気泳動法により分子量を測定した結果、大豆インヒビターの分子量は 22,000、大豆ペプチドは 18,800 であった。

2-2 N-末端アミノ酸の測定

次にダンシルクロリド法を用いて、各インヒビターの N-末端アミノ酸を調べた。各インヒビターの N-末端アミノ酸をダンシル化し、それを加水分解したものと、標準アミノ酸とを薄層クロマトグラフィーにプロットして、3種類の展開溶媒を用いて、一次元、二次元に展開した。その結果、インヒビター A と、A-ペプチドの N-末端アミノ酸はともに、スレオニンであ

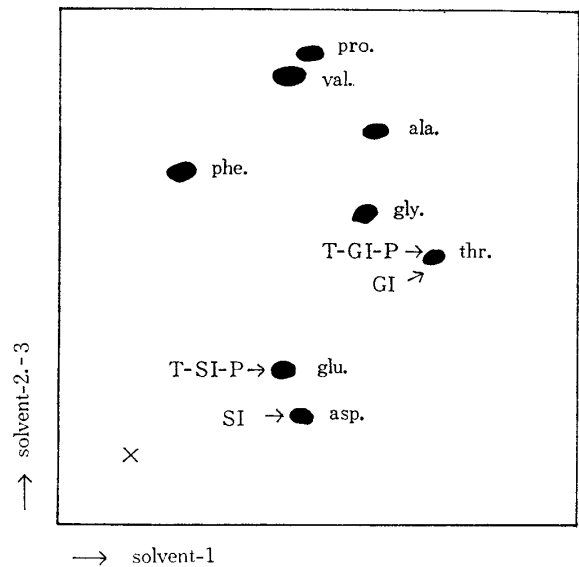


図4 DNS-アミノ酸のクロマトグラム

GI: 小麦胚芽インヒビター A

T-GI-P: 小麦胚芽インヒビター生成物

SI: 大豆インヒビター

T-SI-P: 大豆インヒビター生成物

た。次に大豆インヒビターの N-末端は、アスパラギン酸で概知の事実と一致した。また大豆ペプチドは、グルタミン酸であった (図4)。

2-3 アミノ酸組成の測定

次に各インヒビターのタンパク質構成アミノ酸を表1に示した。

小麦のタンパク質として代表されるグルテニンの主な構成アミノ酸は、グルタミン酸 32.8%、プロリン 13.4%、グリシン 9.2% でこれら3種類で50%以上をしめ、その他のアミノ酸は、1.5%~3.1%である。それに比べてインヒビターのアミノ酸組成は、主要アミノ酸として、グルタミン酸であるが、グルテニンに比較して塩基性アミノ酸のリジン、アルギニン、酸性アミノ酸のアスパラギン酸が多く、また、プロリンが少

表1 インヒビターおよび反応生成物の
アミノ酸組成

アミノ酸	GI-A	T-GI-P	SI	T-SI-P
Lys.	6.2	2.1	6.1	5.9
His.	1.8	1.5	1.3	1.2
Arg.	8.0	2.7	5.5	4.7
Asp.	7.8	10.8	16.5	15.2
Thr.	5.9	2.9	4.1	4.1
Ser.	7.2	9.7	7.3	8.7
Glu.	17.6	26.7	12.0	11.5
Pro.	2.0	1.7	3.3	3.0
Gly.	15.8	17.0	6.7	9.9
Ala.	11.3	2.5	4.8	5.3
Cys.	1.3	1.8	1.9	2.2
Val.	3.7	2.9	6.2	6.2
Met.	1.6	4.2	1.5	0.9
Ileu.	2.1	2.9	7.0	6.9
Leu.	4.2	3.0	8.0	7.8
Tyr.	1.9	6.0	2.6	2.3
Phe.	1.6	1.6	5.2	4.2

(mole %)

GI: 小麦胚芽インヒビター A, T-GI-P: 小麦胚芽
インヒビター生成物SI: 大豆インヒビター, T-SI-P: 大豆インヒビ
ター生成物

なかった。

IV. 総 括

トリプシン・インヒビターが体内に摂取された場
合, ペプシンとの反応において, 完全に失活されず,

トリプシンを阻害すると予測される。またインヒビターはトリプシンを阻害するだけでなく, トリプシンと反応して, 低分子化されたペプチドを生成し, しかもこのペプチドもトリプシンに対して阻害活性を示すことが認められた。このような事実は, 食品中のタンパク質の栄養学的な評価において一つの問題を提起するものであると考える。

最後に, 本実験にあたり御指導下さいました本学の光永俊郎助教授に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Kunitz, M., *J. Gen. Physiol.*, **29**, 149 (1946)
- 2) Pressey, R., *J. Food Sci.*, **37**, 521 (1972)
Belew, M., Porath, J. and Sundberg, L., *Eur. J. Biochem.*, **60**, 247 (1975)
Boisen, S., *Phytochemistry*, **15**, 641 (1976)
- 3) Mitsunaga, T., *J. Nutr. Sci., Vitaminol.*, **20**, 153 (1974)
- 4) Mitsunaga, T., in press.
- 5) Erlanger, B. F., Kokwshy, N. and Cohen, W., *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271 (1961)
- 6) Ornstein, L. and Davis, B., *Ann. New York Acad. Sci.*, **321**, 404 (1964).
- 7) Shapiro, A. L., Vinnela, E. and Majiel, J. V. Jr., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 815 (1967).
- 8) Andrews, P., *Biochem. J.*, **96** 595 (1965).
- 9) 成田耕造, 村地孝編 “生化学実験講座 1, タンパク質の化学Ⅱ” 東京化学同人, p. 142 (1976)